



06-11-01



23448

PATENT, TRADEMARK OFFICE

PATENT APPLICATION

JC17 Rec'd PCT/PTO 0.8 JUN 2001

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re United States Patent Application of:

Applicant: SEDLACEK, et al.

Application No.: New U.S. National Stage Application of
PCT International Application
PCT/DE99/03972

International Filing Date: 8 November 1999

Priority Date Claimed: 10 December 1998 (German Appl. No. 198
56 882.7 337.3)

Title: SPERMATOGENESIS PROTEIN

09/857902

Atty. Docket No.: 4121-125

EXPRESS MAIL CERTIFICATE

I hereby certify that I am mailing the attached documents to the
Commissioner for Patents on the date specified, in an envelope
addressed to the Commissioner for Patents, Washington, DC 20231,
and Express Mailed under the provisions of 37 CFR 1.10.

Lee Ann Brown

June 8, 2001

Date

EL831358109US

Express Mail Label Number

EL831358109US

**SUBMISSION UNDER 35 U.S.C. §371 OF UNITED STATES PATENT
APPLICATION (NATIONAL PHASE PROCEEDINGS) BASED ON
INTERNATIONAL APPLICATION NO. PCT/DE99/03972 AND CLAIMING
PRIORITY OF GERMAN PATENT APPLICATION NO. 198 56 882.7**

Commissioner for Patents
Box PATENT APPLICATION
Washington, DC 20231

Sir:

Submitted herewith for filing under the provisions of 37 CFR 1.53 and 35 U.S.C. § 371 is the above-
referenced patent application, based on International Patent Application No. PCT/DE99/03972 and

claiming priority of German Patent Application No. 198 56 882.7. A copy of the PCT International Application and related documents as originally filed are included. An English translation of the application is included having 11 pages of specification, 12 pages of sequences, 2 pages of claims, 1 page of Abstract, 9 sheets of Figures and a disk with sequence listings in PatentIn 2.1. The International Preliminary Examination Report and Appendix are included, not translated into English. The EPO Search Report is included. Also included is an unsigned Declaration and Power of Attorney, a check in the amount of \$430.00, fee transmittal form and a transmittal letter.

Please direct correspondence relating to this application to Steven J. Hultquist, Intellectual Property Technology Law, P.O. Box 14329, Research Triangle Park, NC 27709, and direct telephonic communications relating to this application to Marianne Fuierer at (919) 419-9350.

Respectfully submitted,



Marianne Fuierer
Registration No. 39,983
Attorney for Applicants

**INTELLECTUAL PROPERTY/
TECHNOLOGY LAW**
P.O. Box 14329
Research Triangle Park, NC 27709
Tel: (919) 419-9350
Fax: (919) 419-9354
Attorney Ref.: 44121-125

PC/DE 99/03972
BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

**PRIORITY
DOCUMENT**
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)



REC'D	07 FEB 2000
WIPO	PCT

PRIORITY

Bescheinigung

Die Anmelderin Deutsches Krebsforschungszentrum Stiftung des öffentlichen
Rechts in Heidelberg, Neckar/Deutschland hat eine Patentanmeldung unter der
Bezeichnung

"Spermatogenese-Protein"

am 10. Dezember 1998 beim Deutschen Patent- und Markenamt eingereicht.

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprüng-
lichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

Die Anmeldung hat im Deutschen Patent- und Markenamt vorläufig die Symbole
C 07 K, A 61 K und C 12 N der Internationalen Patentklassifikation erhalten.

München, den 25. Januar 2000

Deutsches Patent- und Markenamt

Der Präsident

Im Auftrag

tenzeichen: 198 56 882.7

Weihmayr

Unser Zeichen: K 2606 - hu / wd

Spermatogenese-Protein

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Spermatogenese-Protein, eine für ein solches Protein kodierende DNA und ein Verfahren zur Herstellung eines solchen Proteins. Ferner betrifft die Erfindung gegen das Protein gerichtete Antikörper sowie die Verwendung der DNA und des Proteins zur Untersuchung bzw. Beeinflussung der Spermatogenese.

Mit Spermatogenese wird die Bildung von Spermien in Säugetieren bzw. dem Menschen bezeichnet. Diese Bildung erfolgt in den Hoden. Während der Spermatogenese, insbesondere dem Pachytän-Stadium der Meiose, lagern sich die X- und Y-Chromosomen aneinander und bilden einen sog. Sexkörper aus. In diesem liegen die X- und Y-Chromosomen inaktiv vor, d.h. sie werden nicht transkribiert.

Es hat sich nun gezeigt, daß von einigen Genen der X- und Y-Chromosomen Partner-Gene existieren, die autosomal lokalisiert sind. Diese werden u.a. in den Hoden exprimiert, wodurch ihre Genprodukte in der Spermatogenese kompensatorische Funktionen hinsichtlich der entsprechenden inaktivierten Gene der X- und Y-Chromosomen haben.

Ein Eingreifen in die Spermatogenese ist nachwievor ein großes Problem. Dies liegt insbesondere daran, daß die Spermatogenese nicht im Detail verstanden ist.

Der vorliegenden Erfindung liegt somit die Aufgabe zugrunde, ein Mittel bereitzustellen, mit dem die Spermatogenese untersucht und ggfs. Wege aufgezeigt werden können, mit denen in die Spermatogenese eingegriffen werden kann.

Erfindungsgemäß wird dies durch die Gegenstände in den Patentansprüchen erreicht.

Die vorliegende Erfindung beruht auf den Erkenntnissen des Anmelders, daß das X-chromosomal lokalisierte Gen XAP-5 ein Partner-Gen aufweist, das autosomal lokalisiert ist und in vielen Geweben exprimiert wird. Beispielsweise ist die Expression in den Hoden zu finden, wobei sie hier besonders stark ist in der Spermatogenese, insbesondere in den Stadien der primären und sekundären Spermatocyten sowie der runden Spermatiden. Das Partner-Gen wird mit X5L bezeichnet und ist im humanen Genom auf Chromosom 6 in der Region 6pter lokalisiert. Der Anmelder hat X5L auf dem PAC-Klon LLNLp 704K12294Q13 isoliert und charakterisiert. Die DNA umfaßt eine kodierende Sequenz und ein Intron und führt zu einer etwa 1.6 kb großen cDNA. Diese kodiert für ein etwa 37 kD großes, 325 Aminosäuren umfassendes mit X5L-Protein bezeichnetes Spermatogenese-Protein (vgl. Figuren 1, 2 und 5,6). Ferner hat der Anmelder erkannt, daß Mutationen im X5L-Protein die Spermatogenese beeinträchtigen können.

Erfindungsgemäß werden die Erkenntnisse des Anmelders genutzt, ein Spermatogenese-Protein (X5L-Protein) bereitzustellen, umfassend die Aminosäuresequenz von Fig. 1 oder eine hiervon durch ein oder mehrere Aminosäuren unterschiedliche Aminosäuresequenz, wobei zwischen letzterer Aminosäuresequenz und der Aminosäuresequenz von Fig. 1 eine Homologie von mindestens 80 % vorliegt.

Der Ausdruck "eine durch eine oder mehrere Aminosäuren unterschiedliche Aminosäuresequenz" umfaßt jegliche für ein X5L-Protein kodierende Aminosäuresequenz, die zu jener von Fig. 1 eine Homologie von mindestens 80 % aufweist. Die Aminosäuresequenz kann sich von jener von Fig. 1 durch Additionen, Deletionen, Substitutionen und/oder Inversionen einzelner Aminosäuren unterscheiden. Insbesondere kann die Aminosäuresequenz jene von Fig. 3 sein.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist eine Nukleinsäure, die für ein X5L-Protein kodiert. Die Nukleinsäure kann eine RNA oder eine DNA, z.B. eine cDNA, sein. Bevorzugt ist eine DNA, die folgendes umfaßt:

- (a) Die DNA von Fig. 1 oder eine hiervon durch ein oder mehrere Basenpaare unterschiedliche DNA, wobei letztere DNA mit der DNA von Fig. 1 hybridisiert und für ein X5L-Protein kodiert, dessen Aminosäuresequenz eine Homologie von mindestens 80 % zu jener von Fig. 1 aufweist, oder
- (b) eine mit der DNA von (a) über den degenerierten genetischen Code verwandte DNA.

Der Ausdruck "eine durch eine oder mehrere Basenpaare unterschiedliche DNA" umfaßt jegliche für ein X5L-Protein kodierende DNA-Sequenz, die mit der DNA von Fig. 1 hybridisiert und für ein X5L-Protein kodiert, dessen Aminosäuresequenz eine Homologie von mindestens 80 % zu jener von Fig. 1 aufweist. Die DNA-Sequenz kann sich von der DNA von Fig. 1 durch Additionen, Deletionen, Substitutionen und/oder Inversionen einzelner Basenpaare unterscheiden. Insbesondere kann die DNA-Sequenz jene der Figuren 2-4 sein. Der Ausdruck "Hybridisierung" weist auf eine Hybridisierung unter üblichen Bedingungen, insbesondere bei 20°C unter dem Schmelzpunkt der DNA-Sequenz hin.

Die DNAs der Figuren 1-4 wurden als h-X5L-c, h-X5L-g, m-X5L-c bzw. m-X5L-g bei der DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen) unter DSM 12550, DSM 12553, DSM 12552 bzw. DSM 12551 am 26. Nov. 1998 hinterlegt.

Eine erfindungsgemäße DNA kann als solche oder in Kombination mit jeglicher anderen DNA vorliegen. Insbesondere kann eine erfindungsgemäße, für ein X5L-Protein kodierende DNA in einem Expressionsvektor vorliegen. Beispiele solcher sind dem Fachmann bekannt. Im Falle eines Expressionsvektors für E. coli sind dies z.B. pGEMEX, pUC-Derivate, pGEX-2T, pET3b und pQE-8. Für die Expression in Hefe sind z.B. pY100 und Ycpad1 zu nennen, während für die Expression in tierischen Zellen z.B. pKCR, pEFBOS, cDM8 und pCEV4 anzugeben sind. Für die Expression in Insektenzellen eignet sich besonders der Baculovirus-Expressionsvektor pAcSGHisNT-A.

Der Fachmann kennt geeignete Zellen, um die erfindungsgemäße, in einem Expressionsvektor vorliegende DNA zu exprimieren. Beispiele solcher Zellen umfassen die E.coli-Stämme HB101, DH1, x1776, JM101, JM 109, BL21 und SG 13009, den Hefe-Stamm *Saccharomyces cerevisiae* und die tierischen Zellen L, NIH 3T3, FM3A, CHO, COS, Vero und HeLa sowie die Insektenzellen sf9.

Der Fachmann weiß, in welcher Weise die erfindungsgemäße DNA in einen Expressionsvektor inseriert werden muß. Ihm ist auch bekannt, daß diese DNA in Verbindung mit einer für ein anderes Protein bzw. Peptid kodierenden DNA inseriert werden kann, so daß die erfindungsgemäße DNA in Form eines Fusionsproteins exprimiert werden kann.

Desweiteren kennt der Fachmann Bedingungen, transformierte bzw. transfizierte Zellen zu kultivieren. Auch sind ihm Verfahren bekannt, das durch die erfindungsgemäße DNA exprimierte Protein bzw. Fusionsprotein zu isolieren und zu reinigen.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein gegen ein vorstehendes Protein bzw. Fusionsprotein gerichteter Antikörper. Ein solcher Antikörper kann durch übliche Verfahren hergestellt werden. Er kann polyklonal bzw. monoklonal sein. Zu seiner Herstellung ist es günstig, Tiere, insbesondere Kaninchen oder Hühner für einen polyklonalen und Mäuse für einen monoklonalen Antikörper, mit einem vorstehenden (Fusions)protein oder Fragmenten davon zu immunisieren. Weitere "Booster" der Tiere können mit dem gleichen (Fusions)protein oder Fragmenten davon erfolgen. Der polyklonale Antikörper kann dann aus dem Serum bzw. Eigelb der Tiere erhalten werden. Für den monoklonalen Antikörper werden Milzzellen der Tiere mit Myelomzellen fusioniert.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Kit. Ein solcher umfaßt eine oder mehrere der folgenden Komponenten:

- (a) eine erfindungsgemäße DNA,

- (b) ein erfindungsgemäßes Spermatogenese-Protein (X5L-Protein)
- (c) einen erfindungsgemäßen Antikörper, sowie
- (d) übliche Hilfsstoffe, wie Träger, Puffer, Lösungsmittel, Kontrollen, etc.

Von den einzelnen Komponenten können jeweils ein oder mehrere Vertreter vorliegen. Hinsichtlich der einzelnen Ausdrücke wird auf vorstehende Ausführungen verwiesen. Diese gelten hier entsprechend.

Die vorliegende Erfindung ermöglicht es, die Spermatogenese zu untersuchen. Mit einem erfindungsgemäßen Antikörper kann ein X5L-Protein nachgewiesen werden. Es kann eine Beziehung zwischen einem X5L-Protein und Vorgängen in der Spermatogenese hergestellt werden. Ferner kann mit einem X5L-Protein ein gegen dieses Protein gerichteter Autoantikörper nachgewiesen werden. Beide Nachweise können durch übliche Verfahren, insbesondere einen Western Blot, einen ELISA, eine Immunpräzipitation oder durch Immunfluoreszenz, erfolgen. Desweiteren kann mit einer erfindungsgemäßen Nukleinsäure, insbesondere einer DNA und hiervon abgeleiteten Primern, die Organisation und die Expression des für ein X5L-Protein kodierenden Gens nachgewiesen werden. Dieser Nachweis kann in üblicher Weise, insbesondere in einem Southern Blot, über in situ Hybridisierung oder durch PCR, erfolgen.

Darüberhinaus eignet sich die vorliegende Erfindung, Maßnahmen zur Inhibition oder Aktivitätssteigerung eines X5L-Proteins in Personen zu ergreifen. Mit einem erfindungsgemäßen Antikörper kann ein X5L-Protein inhibiert werden. Andererseits kann mit einem X5L-Protein, insbesondere nach Kopplung an ein vom Körper nicht als fremd angesehenes Protein, z.B. Transferrin oder BSA, die Menge eines X5L-Proteins in Personen erhöht werden. Entsprechendes kann auch mit einer erfindungsgemäßen Nukleinsäure, insbesondere einer DNA, erreicht werden, die unter die Kontrolle eines konstitutiven bzw. in bestimmten Geweben, induzierbaren Promotors gestellt wird und nach ihrer Expression zur Bereitstellung eines X5L-Proteins in den Personen bzw. in bestimmten Geweben, z.B. Hoden, dieser führt.

Somit stellt die vorliegende Erfindung Mittel dar, die Spermatogenese zu untersuchen und in sie regulierend einzugreifen. Letzteres umfaßt sowohl ihre Aktivierung als auch ihre Inhibierung. Insbesondere liefert die vorliegende Erfindung Mittel, Störungen der Spermatogenese zu diagnostizieren und zu behandeln.

Kurze Beschreibung der Zeichnungen.

Fig. 1 zeigt die DNA- und Aminosäuresequenzen eines erfindungsgemäßen, 325 Aminosäuren umfassenden Spermatogenese-Proteins (X5L-Protein). Die DNA-Sequenz ist eine humane cDNA.

Fig. 2 zeigt die Sequenzen einer genomischen für ein X5L-Protein kodierenden DNA. Die DNA entstammt dem humanen Genom. Die cDNA von Fig. 1 beginnt am Basenpaar 739. Zwischen den Basenpaaren 828 und 1129 liegt ein Intron vor. Eine Polyadenylierungsstelle befindet sich am Basenpaar 2658.

Fig. 3 zeigt die DNA- und Aminosäuresequenzen eines 334 Aminosäuren umfassenden X5L-Proteins. Die DNA-Sequenz ist eine Maus cDNA.

Fig. 4 zeigt die Sequenz einer genomischen für ein X5L-Protein kodierenden DNA. Die DNA entstammt dem Maus Genom. Die cDNA von Fig. 3 beginnt am Basenpaar 445 von Fig. 4(A). Zwischen den Basenpaaren 492-1232 von Fig. 4(A) liegt ein Intron vor. Zwischen den Basenpaaren 1-1136 von Fig. 4(B) liegt ein Intron vor. Eine Polyadenylierungssequenz befindet sich am Basenpaar 2306 von Fig. 4(B).

Fig. 5 zeigt den Nachweis von mRNA eines X5L-Proteins in Geweben.

Fig. 6 zeigt den Nachweis von mRNA eines X5L-Proteins in Hoden. Das Vorliegen solcher mRNA ist auf Tubuli begrenzt (Fig. 6(A)). Auf

zellulärer Ebene liegt mRNA eines X5L-Proteins in den Stadien der primären und sekundären Spermatoyten (Sterne) sowie der runden Spermatiden (RS) vor. Reife Spermien sind mit (MS) und Spermato gonien mit (Pfeilspitzen) gekennzeichnet. Sertoli-Zellen (Pfeile) und Leydig-Zellen (L) weisen keine mRNA eines X5L-Proteins auf.

Die vorliegende Erfindung wird durch die nachstehenden Beispiele erläutert.

Beispiel 1: Nachweis von mRNA eines X5L-Proteins in Geweben

(A)

RNA-Blots von humanen Geweben, wie Pankreas, Nebennierenmark, Schilddrüse, Nebennierenrinde, Hoden, Thymus, Dünndarm, Magen, fötales Gehirn, fötale Lunge, fötale Leber und fötale Niere, erhalten von Clontech, werden einer Hybridisierung unterzogen. Als Hybridisierungsprobe wird eine [$\alpha^{32}\text{P}$]dCTP markierte X5L-Protein spezifische DNA verwendet, die zwischen den Basenpaaren 1073-1409 der DNA von Fig. 1 liegt. Die Hybridisierung erfolgt übernacht mit anschließenden Waschschritten unter üblichen Bedingungen. Zur Kontrolle werden die Blots ebenfalls mit einer radioaktiven β -actin-Probe hybridisiert (vgl. Fig. 5).

Es zeigt sich, daß mRNA eines X5L-Proteins in den verschiedensten Geweben exprimiert wird. Die Größe der exprimierten mRNA ist 1,7 bzw. 4,3 kb, was auf unterschiedliche Polyadenylierungssignale der DNA von Fig. 1 zurückzuführen ist. Ferner zeigt es sich, daß die Expression von mRNA eines X5L-Proteins in Hoden am stärksten ist.

(B)

Es wird eine RNA in situ Hybridisierung an Maus-Hoden-Gewebe durchgeführt. Hierzu wird auf das Verfahren von Wilkinson, D.G. (1992), Oxford University Press, New York verwiesen. Es werden "antisense"- bzw. "sense" RNA Proben verwendet, die den Basenpaaren 5-1169 der DNA von Fig. 1 entsprechen.

Es zeigt sich, daß in Hoden-Gewebe eine starke Expression von mRNA eines X5L-Proteins stattfindet. Ferner zeigt sich, daß die Expression auf Tubuli beschränkt ist. Auf zellulärer Ebene zeigt sich eine Expression von mRNA eines X5L-Proteins in den Stadien der primären und sekundären Spermatocyten sowie der runden Spermatiden. Spermatogonien, reife Sertoli-Zellen und Leyding-Zellen zeigen dagegen keine Expression von mRNA eines X5L-Proteins.

Beispiel 2: Herstellung und Reinigung eines erfindungsgemäßen Spermatogenese-Proteins (X5L-Protein)

Die DNA von Fig. 1 wird mit BAMHI-Linkern versehen, mit BamHI nachgespalten und in den mit BamHI gespaltenen Expressionsvektors pQE-8 (Qiagen) inseriert. Es wird das Expressionsplasmid pQE-8/X5L erhalten. Ein solches kodiert für ein Fusionsprotein aus 6 Histidin-Resten (N-Terminuspartner) und dem erfindungsgemäßen X5L-Protein von Fig. 1 (C-Terminuspartner). pQE-8/X5L wird zur Transformation von E.coli SG 13009(vgl. Gottesman, S. et al., J. Bacteriol. 148, (1981), 265-273) verwendet. Die Bakterien werden in einem LB-Medium mit 100µg/ml Ampicillin und 25µg/ml Kanamycin kultiviert und 4 h mit 60µM Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranosid (IPTG) induziert. Durch Zugabe von 6 M Guanidinhydrochlorid wird eine Lyse der Bakterien erreicht, anschließend wird mit dem Lysat eine Chromatographie (Ni-NTA-Resin) in Gegenwart von 8 M Harnstoff entsprechend der Angaben des Herstellers (Qiagen) des Chromatographie-Materials durchgeführt. Das gebundene Fusionsprotein wird in einem Puffer mit pH 3,5 eluiert. Nach seiner Neutralisierung wird das Fusionsprotein einer 18 % SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese unterworfen und mit Coomassie-Blau angefärbt (vgl. Thomas, J.O. und Kornberg, R.D., J.Mol.Biol. 149 (1975), 709-733).

Es zeigt sich, daß ein erfindungsgemäßes (Fusions)protein in hochreiner Form hergestellt werden kann.

Beispiel 3: Herstellung und Nachweis eines erfindungsgemäßen Antikörpers

Ein erfindungsgemäßes Fusionsprotein von Beispiel 2 wird einer 18 % SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese unterzogen. Nach Anfärbung des Gels mit 4 M Natriumacetat wird eine ca. 37 kD Bande aus dem Gel herausgeschnitten und in Phosphat gepufferter Kochsalzlösung inkubiert. Gel-Stücke werden sedimentiert, bevor die Proteinkonzentration des Überstandes durch eine SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese, der eine Coomassie-Blau-Färbung folgt, bestimmt wird. Mit dem Gel-gereinigten Fusionsprotein werden Tiere wie folgt immunisiert:

Immunisierungsprotokoll für polyklonale Antikörper im Kaninchen

Pro Immunisierung werden 35 μ g Gel-gereinigtes Fusionsprotein in 0,7 ml PBS und 0,7 ml komplettem bzw. inkomplettem Freund's Adjuvans eingesetzt.

- | | |
|---------|---|
| Tag 0: | 1. Immunisierung (komplettes Freund's Adjuvans) |
| Tag 14: | 2. Immunisierung (inkomplettes Freund's Adjuvans; icFA) |
| Tag 28: | 3. Immunisierung (icFA) |
| Tag 56: | 4. Immunisierung (icFA) |
| Tag 80: | Ausbluten |

Das Serum des Kaninchens wird im Immunoblot getestet. Hierzu wird ein erfindungsgemäßes Fusionsprotein von Beispiel 1 einer SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese unterzogen und auf ein Nitrocellulosefilter übertragen (vgl. Khyse-Andersen, J., J. Biochem. Biophys. Meth. 10, (1984), 203-209). Die Western Blot-Analyse wurde wie in Bock, C.-T. et al., Virus Genes 8, (1994), 215-229, beschrieben, durchgeführt. Hierzu wird das Nitrocellulosefilter eine Stunde bei 37°C mit einem ersten Antikörper inkubiert. Dieser Antikörper ist das Serum des Kaninchens (1:10000 in PBS). Nach mehreren Waschschritten mit PBS wird das Nitrocellulosefilter mit einem zweiten Antikörper inkubiert. Dieser Antikörper ist ein mit alkalischer Phosphatase gekoppelter monoklonaler Ziege Anti-Kaninchen-IgG-Antikörper (Dianova) (1:5000) in PBS. Nach 30-minütiger Inkubation bei 37°C folgen mehrere Waschschrritte mit PBS und anschließend die alkalische Phosphatase-Nachweisreaktion mit Entwicklerlösung (36 μ M 5' Bromo-4-chloro-

3-indolylphosphat, 400 μ M Nitroblau-tetrazolium, 100mM Tris-HCl, pH 9.5, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂) bei Raumtemperatur, bis Banden sichtbar werden.

Es zeigt sich, daß erfindungsgemäße, polyklonale Antikörper hergestellt werden können.

Immunisierungsprotokoll für polyklonale Antikörper im Huhn

Pro Immunisierung werden 40 μ g Gel-gereinigtes Fusionsprotein in 0,8 ml PBS und 0,8 ml komplettem bzw. inkomplettem Freund's Adjuvans eingesetzt.

- Tag 0. 1. Immunisierung (komplettes Freund's Adjuvans)
- Tag 28: 2. Immunisierung (inkomplettes Freund's Adjuvans; icFA)
- Tag 50: 3. Immunisierung (icFA)

Aus Eigelb werden Antikörper extrahiert und im Western Blot getestet. Es werden erfindungsgemäße, polyklonale Antikörper nachgewiesen.

Immunisierungsprotokoll für monoklonale Antikörper der Maus

Pro Immunisierung werden 12 μ g Gel-gereinigtes Fusionsprotein in 0,25 ml PBS und 0,25 ml komplettem bzw. inkomplettem Freund's Adjuvans eingesetzt; bei der 4. Immunisierung ist das Fusionsprotein in 0,5 ml (ohne Adjuvans) gelöst.

- Tag 0. 1. Immunisierung (komplettes Freund's Adjuvans)
- Tag 28: 2. Immunisierung (inkomplettes Freund's Adjuvans; icFA)
- Tag 56: 3. Immunisierung (icFA)
- Tag 84: 4. Immunisierung (PBS)
- Tag 87: Fusion

Überstände von Hybridomen werden im Western Blot getestet. Erfindungs-

gemäße, monoklonale Antikörper werden nachgewiesen.

Patentansprüche

1. Spermatogenese-Protein, umfassend die Aminosäuresequenz von Fig. 1 oder eine hiervon durch ein oder mehrere Aminosäuren unterschiedliche Aminosäuresequenz, wobei zwischen letzterer Aminosäuresequenz und jener von Fig. 1 eine Homologie von mindestens 80 % vorliegt.
2. Spermatogenese-Protein nach Anspruch 1, umfassend die Aminosäuresequenz von Fig. 3.
3. DNA, kodierend für das Spermatogenese-Protein nach Anspruch 1, umfassend:
 - (a) Die DNA von Fig. 1 oder eine hiervon durch ein oder mehrere Basenpaare unterschiedliche DNA, wobei letztere DNA mit der DNA von Fig. 1 hybridisiert und für ein Spermatogenese-Protein kodiert, dessen Aminosäuresequenz eine Homologie von mindestens 80 % zu jener von Fig. 1 aufweist, oder
 - (b) eine mit der DNA von (a) über den degenerierten genetischen Code verwandte DNA.
4. DNA nach Anspruch 3, wobei die DNA jene von Fig. 2, Fig. 3 oder Fig. 4 ist.
5. Expressionsplasmid, umfassend die DNA nach Anspruch 3 oder 4.
6. Transformante, enthaltend das Expressionsplasmid nach Anspruch 5.
7. Verfahren zur Herstellung eines Spermatogenese-Proteins, umfassend die Kultivierung der Transformante nach Anspruch 6 unter geeigneten Bedingungen.

8. Antikörper, gerichtet gegen das Spermatogenese-Protein nach Anspruch 1 oder 2.

5

9. Verwendung des Spermatogenese-Proteins nach Anspruch 1 oder 2 oder einer DNA nach Anspruch 3 oder 4 zur Untersuchung bzw. Beeinflussung von Spermatogenese.

10. Verwendung nach Anspruch 9, wobei die Beeinflussung der Spermatogenese ihre Aktivierung bzw. Inhibierung umfaßt.

10

11. Verwendung nach Anspruch 9, wobei die Untersuchung bzw. Beeinflussung der Spermatogenese eine Diagnose bzw. Behandlung von Störungen der Spermatogenese umfaßt.

K 2606

Zusammenfassung
Spermatogenese-Protein

5

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Spermatogenese-Protein, eine für ein solches Protein kodierende DNA und ein Verfahren zur Herstellung eines solchen Proteins. Ferner betrifft die Erfindung gegen das Protein gerichtete Antikörper sowie die Verwendung der DNA und des Proteins zur Untersuchung bzw. Beeinflussung der Spermatogenese.

10



10 30 50 70 90
 AGAGCCCGGGGCGAGTGGGCTCTGCTCGTGGGTGTTCTCGTGGAGGTGAGCTCCCGCTGTCTCCGCTCGACAGGGTGCTTGGGCAG
 110 130 150 170
 GCCCATCGGGTAGGCGCGGGCCATGGCGCAGTACAAGGGCACCATGCGCGAGGCAGGCCGTGCCATGCACCTCCTCAAGAAGCGCGAAAG
 M A Q Y K G T M R E A G R A M H L L K K R E R
 190 210 230 250 270
 GCAGCGGGAGCAGATGGAGGTGCTGAAGCAGCGCATCCCGCAGGAGACCATCCTCAAGTCCGAGCTGGACAAGAGGTTCTCGGCGCATT
 Q R E Q M E V L K Q R I A E E T I L K S Q V D K R F S A H Y
 290 310 330 350
 CGACGCCGTGGAGGCCCGAGCTGAAGTCCAGCAGGTGGGCTGGTGACCTGAACGACATGAAGGCCCGCAGGAGGCCCTGGTCAGGGA
 D A V E A E L K S S T V G L V T L N D M K A R Q E A L V R E
 370 390 410 430 450
 GCGCGAGCGGCAGCTGGCCAAAGCGCCAGCACCCTGGAGGAGCAGCGGCTGCAGCAGGAGCGGCAGCGGAGCAGGAGCAGCGCGCGAGCG
 R E R Q L A K R Q H L E E Q R L Q Q E R Q E Q E Q R R E R
 470 490 510 530
 CAAGCGTAAGATCTCTGCTGTCTTTGCACTAGACGACCTCGATGACCAGGCCGACGCGCCGAGGCCAGGCGCGCGGAAACCTGGG
 K R K I S C L S F A L D D L D D Q A D A A E A R R A G N L G
 550 570 590 610 630
 CAAGAACCCCGACGTGGACACCAGCTTCTTGCAGACCGCGACCGGAGGAGGAGAGAACCGGCTCCGAGAGGAGCTGCGCCAGAGT
 K N P D V D T S F L P D R D R E E E E N R L R E E L R Q E W
 650 670 690 710
 GGAGGCGCAGCGCGAGAAAGTGAAGGACGAGGAGATGGAGGTACCTTCACTACTGGGACGGCTCGGGCCACCGGCGCAGGTGCGGGT
 E A Q R E K V K D E E M E V T F S Y W D G S G H R R T V R V
 730 750 770 790 810
 GCGCAAGGGCAACACGGTGCAGCAGTTCCTGAAGAAGGCGCTGCAGGGGCTGCGCAAGGACTTCCTGGAGCTGCGCTCCGCGCGGTGG
 R K G N T V Q Q F L K K A L Q G L R K D F L E L R S A G V E
 830 850 870 890
 GCAGCTCATGTTTCATCAAGGAGGACCTCATCTGCGCACTACCAACCTTCTACGACTTCATCATCGCCAGGGCGAGGGGCAAGAGCGG
 Q L M F I K E D L I L P H Y H T F Y D F I I A R A R G K S G
 910 930 950 970 990
 GCGCTCTTTCAGCTTCGATGTGCACGATGACGTGCGCCTGCTCAGCGACGCCACCATGGAGAAGGACGAGTGCACGCGGGCAAGGTGGT
 P L F S F D V H D D V R L L S D A T M E K D E S H A G K V V
 1010 1030 1050 1070
 GCTGCGCAGCTGGTACGAGAAGAACAAGCAGTCTTCCCGCCAGCGCTGGGAGGCCTATGACCCCGAGAAGAAGTGGGACAAGTACAC
 L R S W Y E K N K H I F P A S R W E A Y D P E K K W D K Y T
 1090 1110 1130 1150 1170
 CATCCGCTAACACCCGCTGCCAGAGCGGAACCGGGGTGGGGGAGACACTCATTTCTAGGCCCCATCACCAGTCACCTTGATTTCGTG
 I R
 1190 1210 1230 1250
 ACCTTGATTCTTCCCCCAATTAATAAAGACAGAGGTCTCATGATTCACATGGTTGTGCTATTGCTGATGTTATGCTTTGGTTG
 1270 1290 1310 1330 1350
 TTGGTTGGTCTTTTCTGAGTATTTTAGTGTTGCCACCTGGATTGCTGCTGCTGCTGAGCTGTATTGAACCATGACTGGGCCAC
 1370 1390 1410 1430
 TGTCAGACAGAAATTAGAATAGGAGGCACATTTTACCTGGTGTTATGAGCATGGACTGGGGGCCACAGTGAAGTGAATTGATTCCC
 1450 1470 1490 1510 1530
 GACACAGCTTCTCTGTGTAGTTTGGGTAAGCTTATTAACCCCATGCCTCAGTTTGGTCACCTGTAAAAGGAAATAACAAG
 1550 1570 1590 1610
 GCACTTACTTTATAAGATTGATGTGAGTATTAAGTGAATTAATTTGTAAAACGCTTAGCTCTTAATAAATGTTTCTGTTGTTATTA

Fig. 1

10 30 50 70 90
 GAAACGGTCACGAAACATGAACCTGGTCTGCCCCCTGCTCTTGAGAGTTACAGTGGAAACTGGCATGTTAGAGGCTCACAGTAAAGACACTG
 110 130 150 170
 CTACACTTTAACTCAGTGTCCATGGTTATTAGAGCTTAGAACCCGGGGGAAACTGCTGTATAGAAGAGGTCAAACAAGCTGAGTGCAGG
 190 210 230 250 270
 TTTTGTACGAAACTGGGGGGCGAGTAGGGTCTATTATCAAAGAATGGTTGTGTGGGGCCATAAGAAAGAATTACAGGCAGTGGTGGC
 290 310 330 350
 CAGGTAATGTTTACGAGACGCCACAGCGGGGTAGCATCAGAGGCGGGAGGAGGAGGTTGGAGAGCAGGGCCGTGTTGCAAGGCTCTCTG
 370 390 410 430 450
 GGTGGCCACAGCAGCTTGCCTGCGCCACATTGCTTCTGCTGTTTACAGCTGGGCACGAGAAGGCTCAGCACGCACGCACAGCAGGTG
 470 490 510 530
 GGGGCCCCCTGCCCCACAGCGTGAACACAGGAGCCCCGGCCAGCCACGGCTGGGCAGGGCCAGAAGCGCTCTCCAGGATCCTCCCCG
 550 570 590 610 630
 CGCTGGCCCCCCCCACAGGAGCACCGCCCCCTACCAGGAGCCCGAGCTCTTCCAGGGCCCGCTCCCCGCCAGGGGGCGATCCACCTCC
 650 670 690 710
 ACTTCCTGTTTCCCGCAGCCGCCCTACCAGGAGCCTGGCACTCTCCTCAGGGCCCCCTCCCCGCCAGGGGGCGACCGCTCCACTTCCT
 730 750 770 790 810
 GTGTCCACGGCTGTGCGAGAGCCCGGGGCGAGTGGGCTCTGCTCGTGCGTGGTTCTCGTGAGGTCAGCTCCCGCGTGTCTCCGCTCG
 830 850 870 890
 ACAGGGTGCTTGGGCAGGTAAAGGTCCCGTCAGTAGCCCAACCCCTCTCTGTATGCAGCTCCCAAATTCAGCGCTGCGCTCAGGCATGGC
 910 930 950 970 990
 AGCCACCCGTTACGTGGGGCCGTTCGCATTTGCATTTATTGAGGTCAAATAAAATGCTGGAATGGTGCTGGTGACACTGTGAGGTTG
 1010 1030 1050 1070
 GTGGTTACCTTAGCAGGTGCGGCCAGCCCCGTAACGCTTCCATCACTGCCGAAAGCCCTGTGAGGAGGCGCAGAGCTGAGCATTCCCCG
 1090 1110 1130 1150 1170
 CGTTGCGTGGGGCCCCCTCTACCTGCGCGCTTTTCTCTTTGCTGCAGAGCCCATCGGGTAGGCGGGGCCATGGCGCAGTACAAGGGC
 1190 1210 1230 1250
 ACCATGCGCGAGGCGAGCGTGCATGCACCTCCTCAAGAGAGCGGAAAGGCAGCGGGAGCAGATGAGGTTGCTGAAGCAGCGCATCGCC
 1270 1290 1310 1330 1350
 GAGGAGACCATCCTCAAGTGCAGGTGGACAAGAGGTTCTCGGCGCATTAAGACGCGCTGGAGGCGGAGCTGAAGTCCAGCACGGTGGG
 1370 1390 1410 1430
 CTGGTGACCTGAACGACATGAAGGCCCCGCGAGGAGCCCTGGTCAGGGAGCGCGAGCGGCGAGCTGGCCAAGCGCCAGCACCTGGAGGAG
 1450 1470 1490 1510 1530
 CAGCGGCTGCAGCAGGAGCGGCGAGCGGAGCAGGAGCAGCGCGGAGCGCAAGCGTAAGATCTCCTGCTGTCTTTGCACTAGACGAC
 1550 1570 1590 1610
 CTCGATGACCAGCGCCGACGCGGCGAGGCGAGGCGCGGAAACCTGGGCAAGAACCCCGACGTTGGACACCAGCTTCTTGCAGACCGC
 1630 1650 1670 1690 1710
 GACCGCGAGGAGGAGGAGAACCAGGCTCCGAGAGGAGCTGCGCCAAGAGTGGGAGGCGCAGCGCGAGAAAGTGAAGGACGAGGAGATGGAG
 1730 1750 1770 1790
 GTCACCTTCAGCTACTGGGACGGCTCGGGCCACCGGCGCAGGTCGGGTGCGCAAGGGCAACACGGTGCGAGCAGTTCTTGAAGAAGGGC
 1810 1830 1850 1870 1890
 CTGCGAGGGGTGCGCAAGGACTTCTCTGAGCTGCGCTCCGCGGCGGTGGAGCAGCTCATGTTTCATCAAGGAGGACCTCATCTTCCCGCAC
 1910 1930 1950 1970
 TACCACACCTTCTACGACTTCATCATCGCCAGGGCGAGGGGCAAGAGCGGGCCGCTCTTTCAGCTTCGATGTGCACGATGACGTGCGCCTG
 1990 2010 2030 2050 2070
 CTCAGCGACGCCACCATGGAGAAGGACGAGTCCGACCGGGCAAGGTGGTGTCTGCGCAGCTGGTACGAGAGAACAAGACATCTTCCCC
 2090 2110 2130 2150
 GCCAGCCGCTGGGAGGCTATGACCCCGAGAAGAGTGGGACAAGTACACCATCCGCTAACACCCGCTGCCAGAGCGGAAACCGGGGGT
 2170 2190 2210 2230 2250
 GGGGGGAGACACTCATTTCTAGGCCCATCACCAGTCACTTGATTTCGTGACCTTGATTTCCTCCCCCAATTAAATAAGACAGAGGGT
 2270 2290 2310 2330
 TCTCATGATTACATGTTGTTGTCTATTGCTGATGTTATGCTTTGGTTGCTTGGTTGGTCTTTCTGAGTATTTTAGTGTGCCACCTGG

Fig. 2

Fig. 2 (Fortsetzung)

2350 2370 2390 2410 2430
ATTGCTGCATTGCTCTGCTGAGCTGTATTGAAACCATGACTGGGCCCACTGTCAGACAGAAAATTAGAATAGGAGGCACATTTTTTACCT
2450 2470 2490 2510
GGTGGTTATGAGCATGGACTTGGGGGCCACAGTGACTGAGTTTGATTCCCAGACAGCCTCCTCCTGCTGTGTAGTTTGGGTAAGCTT
2530 2550 2570 2590 2610
ATTAAACCCCATGCCTCAGTTTGGTCACCTGTAAGGAAATAACAAGAGCACTTACTTTATAAGATTGATGTGAGTATTAAGTGAATT
2630 2650 2670 2690
AATATTTGTAAAACGCTTAGCTCTTAATAAATGTTTCTGTGTTATTATTATGGTTTTGGTTAATTTATTTAAAGGACTGCAATGACCTA
2710 2730 2750 2770 2790
GTTCAGAACTATTTGAGGGCAAAGGTGGACCTGCCCATCACTGGTCCCAGGATCAGCAGTTGCCAGCAGGAGGGGGCTAGCAAAGGTTGG
2810 2830 2850 2870
GGAGCAGCCCCCTCTAGTGGGCTTTAGCTGGGTTGTTAGCCCAGAAGTTAGGAGGACAGTGAGCTAATGCAAGTAGCCTGCAG

10 30 50 70 90
 ATTTCGCAAAAGCACCAGAAGGAAGAGTCTTGGCTCATACATCAAAGCTGCAGAATCTGTGAAC TGACATCAGACCCAGAAGGCTACCAG
 110 130 150 170
 AAACAGGGAGCTGGGCAGGCCAAAAAGCCTTGGCTGAAC TGCAGGCATGGCGCAGTACAAAGGCACCATGCGGGAAGCTGGCCGGGCCAT
 M A Q Y K G T M R E A G R A M
 190 210 230 250 270
 GCACCTGATCAAGAAGCGTGAGAAGCAGAAGGAGCAGATGGAGGTGCTGAAGCAGCGCATCGCAGAGGAGACCATCATGAAGTCAAAAGT
 H L I K K R E K Q K E Q M E V L K Q R I A E E T I M K S K V
 290 310 330 350
 GGACAAGAAGTTCTCGGCACACTACGACGCGGTGGAGGCCGAGCTGAAGTCCAGTACGGTGGGCGCTGGTGACCTGAATGACATGAAGGC
 D K K F S A H Y D A V E A E L K S S T V G L V T L N D M K A
 370 390 410 430 450
 CAAGCAGGAGGCCCTGCTGAGGGAGCGGGAGATGCAGCTGGCCAAGAGGAGCAGCTGGAGCAACGCCGGATACAGCTGCAGATGCTGGC
 K Q E A L L R E R E M Q L A K R E Q L E Q R R I Q L E M L R
 470 490 510 530
 CGAGAAGGAGCGAAGGCGAGGCGCAAGCGCAAGATCTCCAACTGTCTTTCACSTTGGACGAGGAAGAAGGTGACCAAGAGGACAGCCG
 E K E R R R E R K R K I S N L S F T L D E E E G D Q E D S R
 550 570 590 610 630
 CCAAGCCGAGAGTGCCGAGGCCCAAGTGTGGAGCCAAAGAAGTCTGGGCAAGAATCCCGATGTGGACACGAGCTTCTGCCCCGACCG
 Q A E S A E A H S A G A K K N L G K N P D V D T S F L P D R
 650 670 690 710
 CGAGCCGAGAGGAGGAGAACCGTTGCGCGAGGAAGTCTGGGCGAGGAGTGGGAGGCGGAAGCGCGAGAAGGTGAAGGGCGAGGAGGTGGA
 E R E E E N R L R E E L R Q E W E A K R E K V K G E E V E
 730 750 770 790 810
 GATCACCTTCAGCTACTGGGATGGCTCCGGCCACCGCGCACGGTGCGCATGAGCAAGGGCAGCACGGTGCGAGCAGTTCTGAGCGGGC
 I T F S Y W D G S G H R R T V R M S K G S T V Q Q F L K R A
 830 850 870 890
 GCTGCAGGGGCTGCGCAGGGACTTCCGGGAGCTGCGGGCAGCGGGCGTGGAGCAGCTCATGTACGTCAAGGAGGATCTCATCTGCCCCA
 L Q G L R R D F R E L R A A G V E Q L M Y V K E D L I L P H
 910 930 950 970 990
 CTATCACACCTTCTACGACTTCATCGTGGCCAAAGCCCGGGCAAGAGCGGCCCGCTCTTCAGCTTCGACGTGCACGAGATGTGCGGCT
 Y H T F Y D F I V A K A R G K S G F L F S F D V H D D V R L
 1010 1030 1050 1070
 GCTGAGCGATGCCACGATGGAGAAAGATGAGTCACACCGCGGCAAGGTGGTGTCTTCGAGCTGGTACGAGAAGAACAAGCACATCTTCCC
 L S D A T M E K D E S H A G K V V L R S W Y E K N K H I F P
 1090 1110 1130 1150 1170
 TGCCAGCCGCTGGGAGCCCTACGACCCCGAGAAGAAGTGGGACAGGTACACCATCCGGTGATGCCAAGTCCAGTTTGGGGACCTTACTC
 A S R W E P Y D P E K K W D R Y T I R
 1190 1210
 CCTAACTATCGAAAATTAATAAATACAGAGGGTCCCCGTAAATCGGA

Fig. 3

10	30	50	70	90
CTAAAACCTGAAAGTTATTCTGATCAACCATACTATACCACATGCAAAATGGAGTCAGAGCTTCTGTCTCCTCTGTAGCTAAGATCACT				
110	130	150	170	
AATGAGTTAATGTATGAAAAGGCAATAAAATCATGCTGTCTGGAGAGTGCCAACTACTTTCAGACTAGTGTATCACGTAAACTCTTTAGTA				
190	210	230	250	270
ACAACCTACACAAAAATTTAATCTGTAATAATCAAAGGCCCAAGTGAGCRAACGACAGTCCAGGAAAACTTCATGGGAGGATTGCATTT				
290	310	330	350	
CAGTTGTCAAGGAGATCAGACGCTGGCAGCAGGACTGCATCCATCAGTCAGTCCAAGTCGGCAGTTATACATGACCACCACCTGATTGGCC				
370	390	410	430	450
CAATCTCTGTCTGATTGGTTAGAGCCTGCCCCTAGCAGTTGGCCAATGTTTTCATATTTTCTGTGTCAAGTTAGAACAAACAATATTCGC				
470	490	510	530	
AAAAGCACCAGAAGGAAGAGTCTTGGCTCATACATCAAAGGTGAGGGGACTGGCTTGAATCCAGCTGGGGCAGATGTGGGAGGTACAGC				
550	570	590	610	630
TCTTTAAACTCGAGTAAACCAATTGTGAAGGGAGTTGAATGTAGAGGAAAGGAATTTGTCCATTATCCTGCAAGCAGGGGAGACTAAT				
650	670	690	710	
GAGCCCTATCGGTGACATAATATCAACATTTTATTGTAATTTAGGAATCACAACCTAGCAGGAAGGAGGAAGATGCCTTAAGGGGCTAT				
730	750	770	790	810
GACATATGCCTAGGAAAAATAGAAATGGGGCTTGTCTCTCTATTGCTTTTCACTGCTGTGTCAAAAGCAACCTAAGGAGGAGGA				
830	850	870	890	
AAGGGTTTATTTTGATTGACTGTTTGACTCACATTTAATCTGACAGCAAGTTGGCAGAAGCACGGAGTCTGTTGTTTCTGTAGTCAGA				
910	930	950	970	990
AAGCCGAGCAAGATAAGGAAGTGCCTTCATCTGCCCTTCCCTATTTCTCCTTTCTACTAGGTCTGAGACTCACGCCCATGGGCATGGTAAG				
1010	1030	1050	1070	
GCCATGTTCAAGATGGTTTGTCTTTCCTCAGTTAAATCTTTCTGAAAATACTCCCACCAGACAACATGCCAAGAGCTGTGTATCCTAAGG				
1090	1110	1130	1150	1170
TTCCAAATCTGTAGTTGACAAGATTAAACATTACATGAGTCTCACCTCTTAACCTCAGGTCTGATACTGTTAGCTTATAGTACTGAAA				
1190	1210	1230		
GCATACTGAAGGCTTCTGTCTCTGCTAGATTGCTCTGAACCTCTCTTTTCTGCCACTGCAG				

Fig. 4 (A)

Fig. 4 (B)

1910	1930	1950	1970
GAAGCGGGCGCTGCAGGGGCTGCCAGGGACTTCCGGGAGCTGCCGGGCAGCGGGCGTGGAGCAGCTCATGTACGTCAAGGAGGATCTCAT			
1990	2010	2030	2050
CCTGCCGCACTATCACACCTTCTACGACTTCATCGTGGCCTAAAGCCCGGGCAAGAGCGGCCCCGCTCTTCAGCTTCGACGTGCACGACGA			
2090	2110	2130	2150
TGTGCCGCTGCTGAGCGATGCCAGATGGAGAAAGATGAGTCACACGCGGGCAAGTGGTCTTCGCAGCTGGTACGAGAAAGAACAAAGCA			
2170	2190	2210	2230
CATCTTCCCTGCCAGCCGCTGGGAGCCCTACGACCCCGAGAAGAAGTGGGACAGGTACACCATCCGGTGATGCCAAGTCCAGTTTGGGG			
2270	2290	2310	2330
ACCTTACTCCCTAATCTATCGAAAAATTAATAAATACAGAGGGTCCCCGTAATCGGATGTGTGGTTCTGTACCTGGCGTCATTCTTCGGT			
2350	2370	2390	2410
GTTTTTAATGTTCTGTTGTGGCTCCTTGTGTCTGTGTGAAAAGGGACATGTTTTTGAATAAGTGGGTTGTGCACATTAGCTTGGTG			
2450	2470	2490	2510
GGCCAGCAGACTGGGTTTGATTTTCTTGCTCAATGTCTTACTTGTGTTGTGAGCAAAATCATTCGGGTCAATTGACTCCTTTTCCCCACC			
2530	2550	2570	2590
TATACAGCAACTTACACCCCTTCAGGCCAGCGTGAGGAGTGAGTTAATATTTGTAAACACTTGGAACTCACTCAGTAAATGCCTGCTGT			
2630	2650	2670	2690
TTTTGTGGGCTGGTTGCTTTACTAAAGAATGCCTACGCGATCCATCTCTGAAATGTCAAAACCAGGGTACCTGCATATGTATTGGT			
2710	2730	2750	2770
TTCAGGGTCAGTCGGTGCCTGAAAGCTGGTGTACAGCTTATAAGATCGGAGCGCTTATTTTCTTATCTTCACCCAAAGCTCACATCTA			
2810	2830	2850	2870
CATGGCAAGATTCTAAATCCCGCCCTTAAAGTTGTATATGTTATTCAATGTTGAGTGTTTTGTTAATTTTCACTTAAAAACGTCTAAAA			
2890	2910	2930	2950
TACAGTGCATCTCTTTCACGGATTTTTTAAAGTTACCCCTTTTATGTTAAAGACCAAGACTTATACTTTGGATCTCTTGCTCTGTTTCTG			
2990			
GCCGTGAGTACTTGCGCCAGCCCAAGAACATGAATTC			

Fig. 4 (B) Fortsetzung)

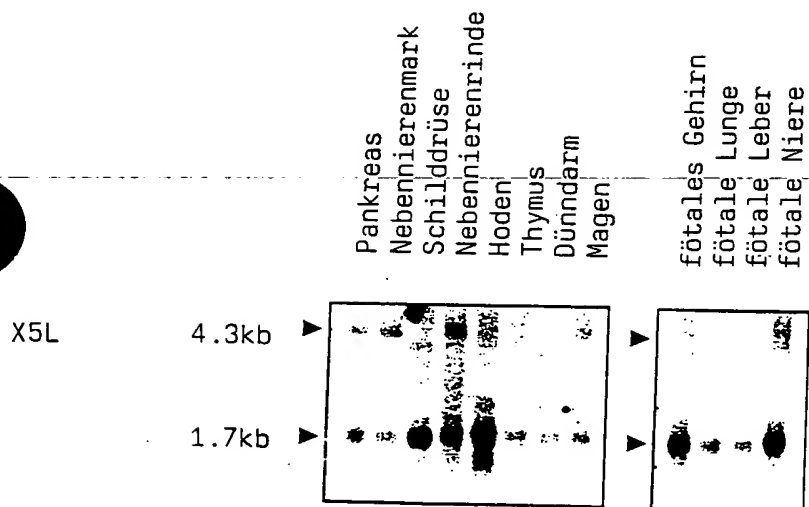


Fig. 5

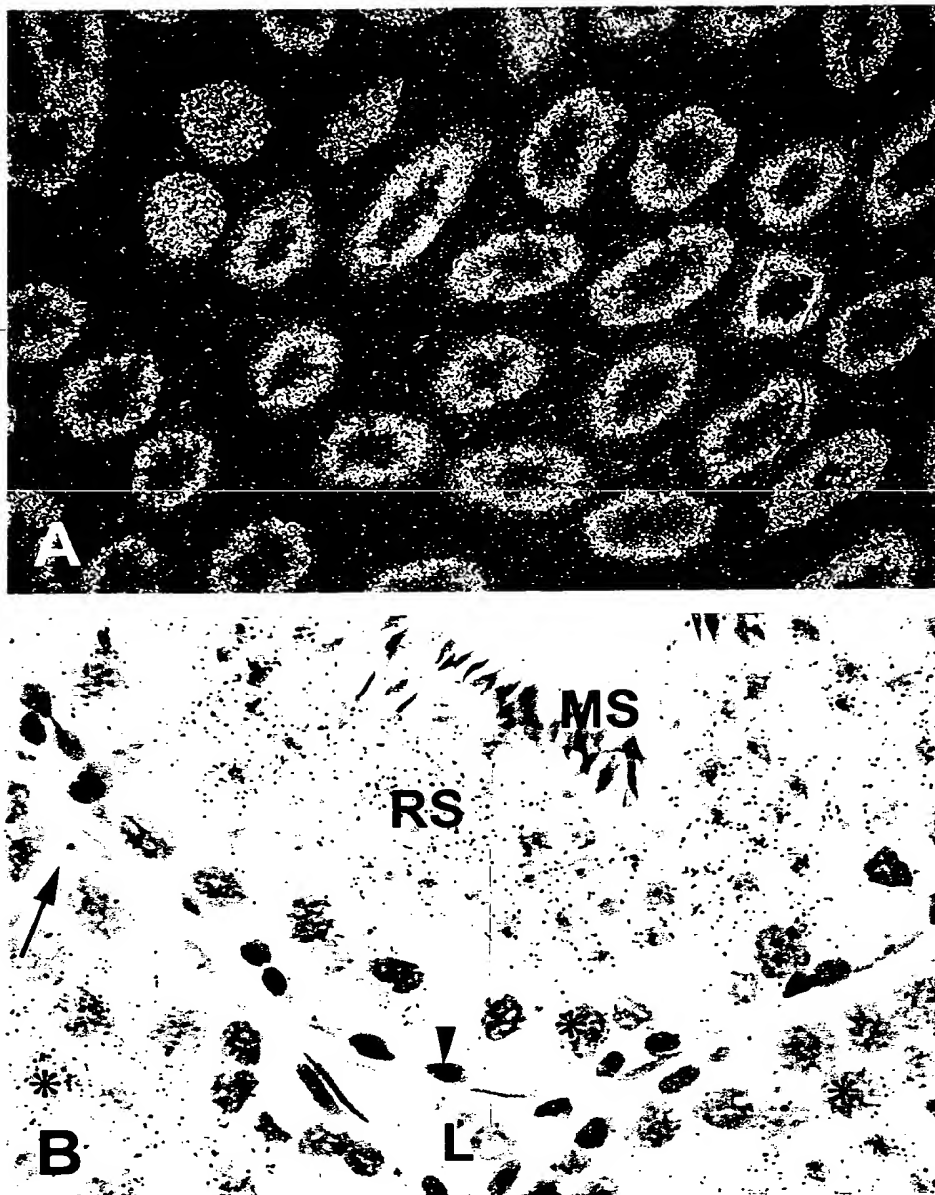


Fig. 6